

LE GENRE RHIZOSPHAERA MANGIN et HARIOT

2. R. PINI, R. KOBAYASHII et R. KALKHOFFII

par F. GOURBIERE* et M. MORELET**

RÉSUMÉ. Description de *Rhizosphaera pini* Cda Maublanc, *R. kobayashii* Morelet et Morelet et *R. kalkhoffii* Bubák (Deuteromycotina, Coelomycetes) colonisant les aiguilles de divers conifères. En culture pure sur PDA, *R. kalkhoffii* présente un mycélium conidien de type *Harmonium* alors que *R. pini* et *R. kobayashii* produisent des pycnidies plus ou moins rudimentaires. Discussion sur le développement et la variabilité de la structure des pycnidies dans le genre *Rhizosphaera*.

SUMMARY. Description of *Rhizosphaera pini* (Cda Maublanc), *R. kobayashii* Morelet et Morelet and *R. kalkhoffii* Bubák (Deuteromycotina, Coelomycetes) colonizing conifer needles. In pure culture on PDA, *R. kalkhoffii* gives a *Harmonium* like state. *R. pini* and *R. kobayashii* produces more or less rudimentary pycnidia. Discussion on the development and variability in the structure of pycnidia in the genus *Rhizosphaera*.

Nous poursuivons dans cette note l'étude critique du genre *Rhizosphaera* commencée précédemment (GOURBIERE et MORELET, 1979), qui vient compléter la monographie de KOBAYASHI (1967) en particulier par la description des stades culturaux.

De récentes récoltes nous ont permis d'isoler *R. pini* Cda Maublanc dont aucune culture n'était disponible et grâce à l'obligeance de T. KOBAYASHI, nous avons pu étudier un échantillon et une culture de *R. kobayashii* Morelet

* Laboratoire d'Écologie Végétale, Université Lyon I, Bat. 741, Bd du 11 novembre 1918, 69621 Villeurbanne, France

** Laboratoire de Pathologie Forestière, CNRF, Champenois, 54280 Seichamps, France

Morelet. Pour être complets nous y joignons une description de *R. kalkhoffii* BLBAK, bien que cette espèce ait déjà été décrite en culture par WATERMAN (1947).

Des six espèces décrites à ce jour, seule *R. media* Morelet n'a pu être cultivée, faute de récoltes récentes.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les coupes de pycnides sont effectuées au microtome (10 μ m) après fixation des aiguilles au mélange de Bouin-Hollande et inclusion dans la paraffine. Les colorations sont réalisées par la méthode acide périodique-Schiff-FAS. Les spores sont mesurées après montage des pycnides ou de fragments de cultures dans le lactophénol, cinquante conidies sont dessinées à la chambre claire et mesurées sur le dessin. Dans chaque cas nous donnons la moyenne et les valeurs maximales (sans tenir compte des valeurs extrêmes isolées).

Les cultures de *R. pini* et *R. kalkhoffii* ont été obtenues par repiquage de pycnides entières sur PDA, l'identité des cultures obtenues étant vérifiée par la formation de pycnides sur aiguilles stérilisées d'*Abies alba* Mill. (voir GOURBIERE et MORELET, 1979), pycnides toujours semblables à celles d'origine.

Les cultures sont décrites sur PDA (Difco) à 20°C, à l'obscurité en boîte de Petri plastique de 90 mm de diamètre scellées avec du parafilm pour éviter la dessiccation. L'observation microscopique a souvent été faite sur le même milieu dilué au 1/2 ou au 1/4 (réajusté à 15g par litre d'agar), la croissance moins dense rendant alors l'observation plus aisée.

L'observation en microscopie optique ne nous ayant pas permis d'identifier de façon certaine le mode de formation (nolo ou enteroblastique) des conidies, nous en publierons prochainement une étude en microscopie électronique.

2. STRUCTURE DES PYCNIDES EN NATURE

Dans notre première note nous avons rappelé les caractéristiques générales de cette structure bien typique du genre. Nous vous invitons revenir ici sur quelques détails, en particulier de la paroi, car les observations des différents auteurs ne sont pas en parfait accord à ce sujet. Peut-être cela tient-il à la difficulté d'obtenir de bonnes coupes d'aiguilles sans détériorer ces fragiles structures superficielles. Ces observations portent surtout sur *R. pini* dont nous avons pu étudier de nombreuses récoltes.

La paroi est formée dans tous les cas d'une seule assise de cellules; ceci est très net sur les coupes minces parfaitement diamétrales, mais des coupes épaisses ou mal orientées peuvent donner l'impression de plusieurs couches. MANGIN et HARIOT (1907) décrivent et figurent cette paroi continue, régulièrement celluleuse. Par contre MAUBLANC (1907), confirmant une obser-

vation antérieure de VUILLEMIN 1896, la décrit discontinue des plages non celluluses étant seulement limitées par un dépôt amorphe brunâtre, dépôt d'ailleurs bien décrit et figure par MANGIN et HARIOT à l'extérieur de la paroi pycnidienne. Ces auteurs avaient également observé que le sommet de la pycnide portait l'empreinte du bouchon circulaire du stomate, nous avons constaté (fig. 1) que cette structure est entièrement formée par ce dépôt.

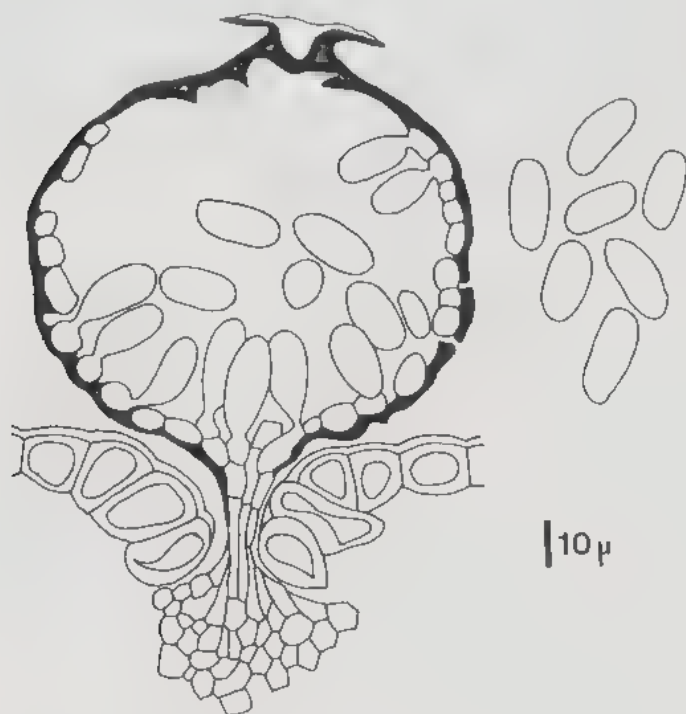


Fig. 1. - *Rhizosphaera pini*, pycnide et conidies sur *Abies alba*.

A la suite de ces observations et de celles concernant *R. oudemansii* et *R. macrospora* GOUBIERE et MORELET, 1979, où la paroi celluluse est encore plus réduite, il nous paraît difficile de ne voir dans ce dépôt que le produit de la gélification des parois externes des cellules de la paroi comme le font MANGIN et HARIOT. Nous verrons que l'observation des cultures permet de formuler une autre hypothèse. Signalons enfin que KOBAYASHI n'a pas décrit ni figuré ces structures.

Un autre détail sujet à controverse est la présence à l'intérieur de la pycnide, de filaments conidiogènes comme la paroi, libres, d'abord considérées comme

des conidiophores. Cette observation entraîna la création du genre *Rhizophoma* par PETRAK et SYDOW 1927 pour *R. kalkhoffii* dépourvus des soit disant conidiophores. KOBAYASHI a montré que ce caractère n'avait en fait que peu d'importance, les filaments internes ayant même valeur que ceux formant la paroi. Si nous les avons observés en grande abondance chez *R. oudemansii* et *R. macrospora*, nous ne les avons pas retrouvés chez les trois espèces étudiées ici, ou pourtant KOBAYASHI les avait figurés. Tout au plus observons nous une sorte de coussinet conidiogène à la base de la pycnide. Le caractère est à l'évidence très variable chez ces espèces. Il a aussi le comportement en culture a apporté quelques explications.

Le développement même de la pycnide est décrit différemment par les différents auteurs. MANGIN et HARIOT observent d'emblée la formation d'une cavité creuse par les filaments issus du stroma sous stomatique, alors que WATERMAN et KOBAYASHI décrivent une pycnide d'abord remplie de tissu pseudoparenchymateux qui se désagrège ensuite.

3. *RHIZOSPHAERA PINI* (CORDA) MAUBLANC

Bull. Soc. Mycol. Fr. 23: 171, 1907.

a) **Matériel étudié.** - Herbar F. Gourbière (Lyon) n° 7, rameau desséché d'*Abies alba* Mill., 10 / 1977, environs du Lac Chalam, Jura, France, altitude 540 m. Coll. Gourbière

b) **Stade pycnidien en nature** fig. 1. La structure des pycnides ayant été décrite ci-dessus et ne différant pas chez les trois espèces étudiées nous ne donnerons que la biométrie des spores. Celles-ci sont unicellulaires, hyalines, elliptiques cylindriques, à bords sub parallèles et extrémités arrondies. Sur l'échantillon n°7 elles mesurent $19,3 \text{ (} 17-22 \text{)} \times 9,7 \text{ (} 10 \text{)} \mu\text{m}$. Les conidies des pycnides obtenues in vitro sur aiguilles à partir de la culture B1 décrite ci-dessous mesurent $17,3 \text{ (} 15-21 \text{)} \times 7,8 \text{ (} 6-10 \text{)} \mu\text{m}$.

c) **Stade mycélien en culture**. La culture B1 décrite a été obtenue à partir de la récolte n° 7.

Croissance lente sur PDA à 20°C, les colonies n'atteignant que 25mm en 21 jours.

Aspect partie centrale élevée, duveteuse, brun noir, marge cohérente appliquée, jaunâtre sur quelques millimètres.

Microscopie fig. 2. Le mycélium submergé est peu différencié, formé d'hyphes de 5-15µm de large, hyalines, très contournées et ramifiées, à paroi souvent épaisse. Mycélium aérien formé d'hyphes de même largeur mais branlées et souvent incrustées de granulations sombres (a). Les extrémités sont recouvertes d'une gaine de mucilage et leurs cellules terminales s'élargissent (b). A partir de là deux évolutions sont possibles. Soit les parois s'épaississent et brunissent, les cellules prenant alors un aspect de chlamydospores (c-d). Soit (e, f, g, on

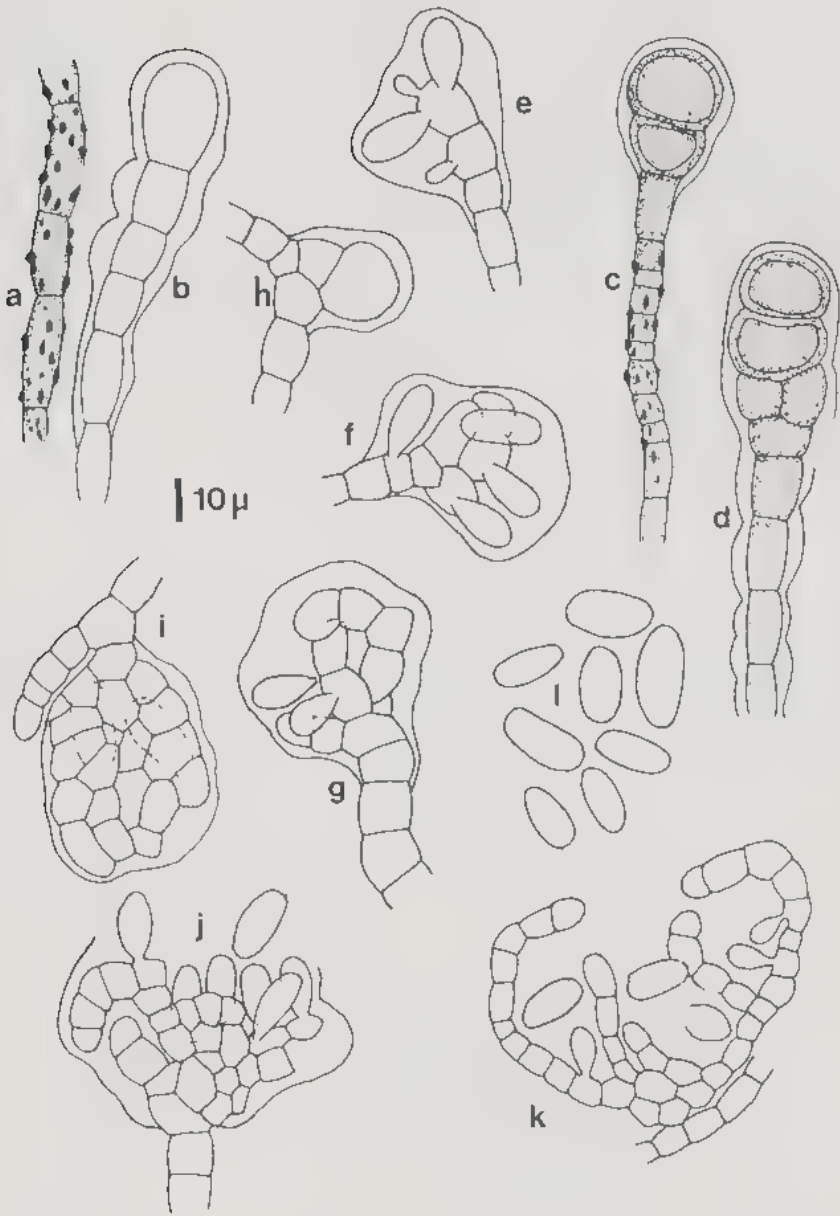


Fig. 2. *Rhizosphaera pini* culture sur PDA (voir texte pour détails)

assiste à la formation de courts rameaux qui produisent très tôt des conidies, l'ensemble restant inclus dans le mucilage. Cette évolution peut aussi se produire à partir de cellules intercalaires h. Les filaments en se développant tendent à épouser le contour de la gouttelette de mucilage, délimitant ainsi une cavité interne i contenant les conidies et qui est déjà une ébauche de pycnide. Souvent à ce stade la prolifération conidienne rompt la pycnide j, qui prend alors un aspect de stroma conidiogène. Cependant la structure close est parfois bien conservée k en coupe et ressemble alors tout à fait à une pycnide naturelle, les conidies étant produites par les cellules de la paroi.

Conidies semblables à celles des pycnides naturelles i beaucoup plus abondantes sur PDA dilué au 1/4 où le mycélium aérien moins développé est envahi par le mucilage conidien.

Biométrie. Sur culture jeune (15 jours) : 17,8 (15-21) x 8,3 (7-11) μm

Sur culture âgée (28 jours) : 18,0 (12-23) x 8,1 (6-11) μm .

4 RHIZOSPIHAERA KOBAYASHII (MORELET) MORELET

Bull. Soc. Sci. nat. Archeol. Var 29: 8, 1973.

a) Matériel étudié TMF FPH 3088, sur *Pinus pumila* Regel, Mt. Komagatake Miyata mura, Nagano Prefecture, Japon, Septembre 1966, Coll. Tetsushige Kubo. Culture correspondante R24



Fig. 3 — *Rhizosphaera kobayashii*, pycnide et conidies sur *Pinus pumila*

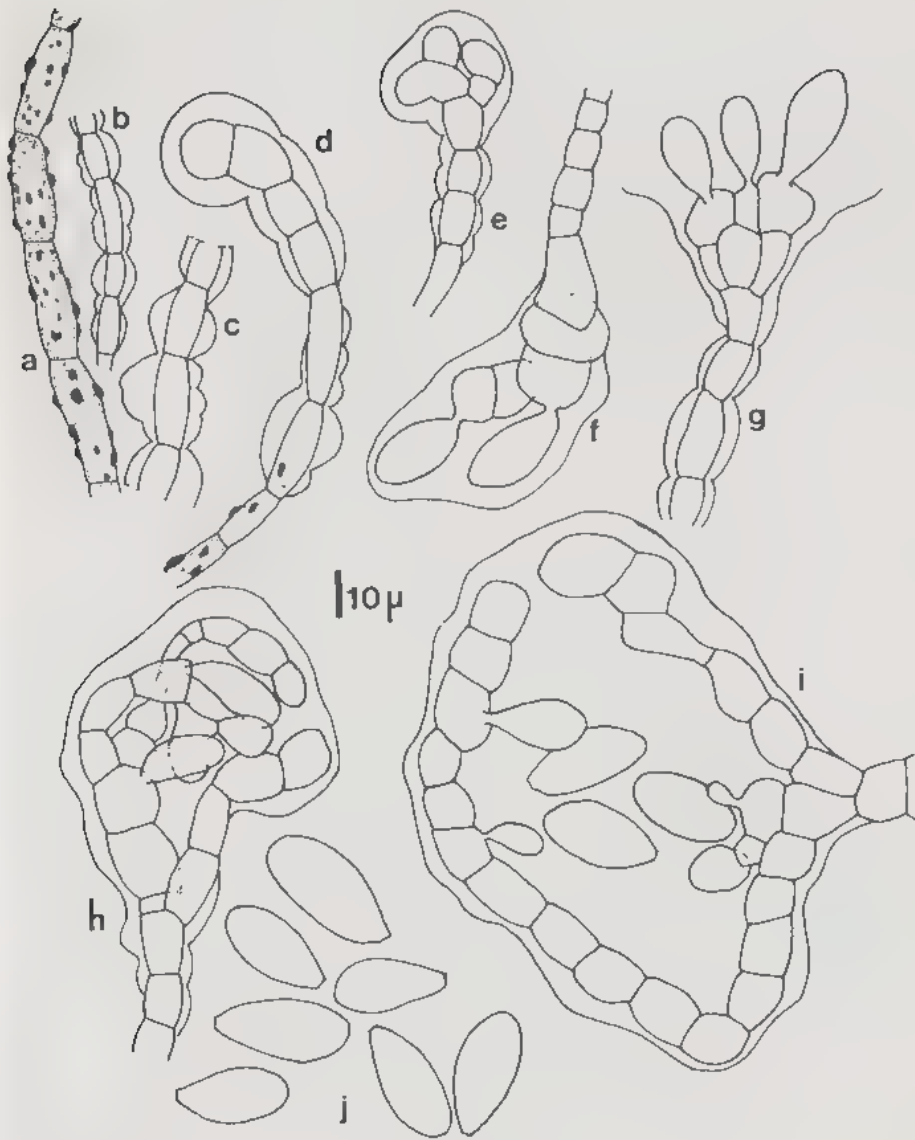


Fig. 4. *Rhizosphaera kobayashii*, culture sur PDA (voir texte pour le détail)

b) Stade pycnidien en nature fig 3. Très semblable aux pycnides de *R. pini*, les différences figurées ne sont certainement pas significatives car nous n'avons pu étudier qu'un échantillon de *R. kobayashii*

Sur cet échantillon les conidies mesurent $28,4 \times 10,8 \times 12 \mu\text{m}$. Sur les pycnides obtenues in vitro sur aiguilles stérilisées d'*Abies alba* Mill., à partir de la souche R2.4, nous avons trouvé des conidies un peu plus larges : $27,9 \times 23-34 \times 12,6 \times 11,15 \mu\text{m}$. Elles sont unicellulaires, hyalines, ovoïdes allongées, nettement tronquées à la base. Ce dernier détail, déjà noté par KOBAYASHI (1967), n'a jamais été retrouvé chez *R. pini* malgré la similitude de formation des conidies.

c) Stade mycélien en culture Croissance sur PDA à 20°C lente, un peu moins cependant que *R. pini*, colonies de 37mm de diamètre après 21 jours

Aspect : colonie jeune 7-15 jours duveteuse, gris brun sale, à marge cohérente appliquée un peu duveteuse blanche. Ensuite la partie centrale s'élève, s'ondule et s'assombrit, puis le mycélium aérien est envahi par un mucilage clair conidies rendant la surface brun noir luisante sauf à la marge restée claire. Cette description correspond bien aux quelques indications données par KOBAYASHI (1967).

Microscopie fig. 4 Mycélium submergé très semblable à celui de *R. pini* hyphes hyalines de $5,15 \mu\text{m}$ de large, contournées ramifiées, stériles, à paroi souvent épaissie. Mycélium aérien présentant des différenciations semblables à celles de *R. pini* hyphes larges de $5,15 \mu\text{m}$, avec des dépôts granuleux a, et des gaines de mucilages annelées selon les cloisons (b, c, extrémités élargies très mucilagineuses d, mais n'évoluant guère en chlamydo-spores. La cellule terminale se divise e, pour donner un petit massif cellulaire qui produit aussitôt des conidies dans le mucilage. Cette structure peut se rompre prématurément g, ou évoluer h, i en pycnide. L'abondance du mucilage permet de l'observer très nettement autour des pycnides. Nous pensons que c'est à ce mucilage, après dessiccation, qu'il faut attribuer la couche amorphe observée sur les pycnides en nature. Le stade cultural sur PDA produit donc, comme chez *R. pini*, des pycnides frustes, mais assez proches des pycnides naturelles, comme l'avait déjà noté KOBAYASHI (1967).

Conidies semblables à celles des pycnides en nature, mais toutefois plus larges, parfois presque en citron (j), toujours tronquées à la base.

Biométrie. Sur culture jeune (15 jours) : $26,1 (22-33) \times 13,7 (12-16) \mu\text{m}$

Sur culture âgée (28 jours) : $25,4 (20-29) \times 12,5 (10-15) \mu\text{m}$.

5. RHIZOSPHAERA KALKHOFFII BUBAK

Ber. Deut. Bot. Ges. 32: 190, 1914.

Cette espèce est la mieux connue et nous ne la décrivons ici qu'à titre de comparaison.

a) Matériel étudié. Herbarier Gourbière n° 11, sur *Picea glauca* Moench Voss. 9.12. 1977, Arboretum d'Amance, Nancy, France. Coll. Morelet.



Fig 5. — *Rhizosphaera kalkhoffii*, pycnide et conidies sur *Picea glauca*.

b) **Stade pycnidien en nature** (fig. 5) — Nos observations sont en accord avec celles des auteurs: WATERMAN 1947, KOBAYASHI 1967, compte tenu des mêmes remarques que précédemment sur les variations de détail.

Sur notre échantillon les conidies mesurent $6,6 (5-8) \times 3,2 (2,5-4) \mu\text{m}$. Sur les pycnides réobtenues en culture sur aiguilles d'*Abies alba* nous avons trouvé $6,7-6,8,5 \times 3,6-2,5-4,5 \mu\text{m}$. Les conidies sont unicellulaires, elliptiques ovoïdes, hyalines. Elles se distinguent tout de suite de celles des autres *Rhizosphaera* par leur petite taille.

c) **Stade mycélien en culture** — La culture B4 décrite provient de l'échantillon n° 11 et correspond parfaitement aux descriptions des cultures de *R. kalkhoffii* données précédemment par WATERMAN 1947 et KOBAYASHI (1967).

Croissance assez rapide: 55mm en 21 jours, plus que *R. pui* et *R. kobayashi*, moins que *R. oudemansii* et *R. macrospora*.

Aspect — Pas de mycélium aérien, mycélium superficiel et submergé finement radié d'abord très clair (MUNSELL 25 Y 6/6, 7/6, 8/6) puis noircissant avec une nuance brun verdâtre (5Y 6/6, 6/6, 6/8, 7/6, 7/8). Le centre se recouvre d'une masse gluante de conidies qui noircit ensuite et se dessèche en donnant une croûte noir mate.

Microscopie fig 6. Mycélium submerge hyalin peu sporifère. Mycélium superficiel formé d'hyphes de 5-15 μm de large, hyalines dans les cultures jeunes, produisant des conidies sur toute leur longueur. a. Cellules conidiogènes indifférenciées, le plus souvent intercalaires, mais parfois terminales sur de courts rameaux latéraux. b. Conidies à développement blastique. Dans les parties âgées le mycélium brunit, par endroit les cellules se cloisonnent transversalement et longitudinalement, brunissent et se séparent plus ou moins en libérant dans la masse gélatineuse formée par les conidies qui peuvent elles aussi brunir des éléments uni, bi ou pluricellulaires. g. à allure de chlamydozoospores. Ces cellules peuvent encore produire des conidies en petit nombre. Nous n'avons pas observé les endospores signalées par KUMI et LANG (1979).

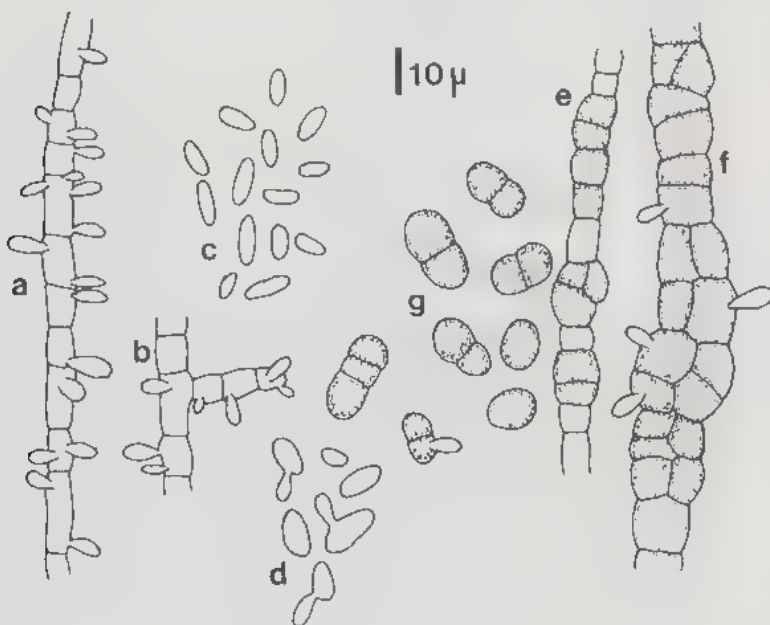


Fig. 6. *Rhizosphaera kalkhoffii*, culture sur PDA (voir texte pour le détail).

Conidies semblables à celles des pycnides.

Biométrie. Sur culture jeune (7 jours) : 7,1 (5-10) x 3,3 (2,5-4) μm

Sur culture âgée (28 jours) : 8,5 (7-10,5) x 3,5 (3-4,5) μm .

Nous avons observé des bourgeonnements secondaires sur les conidies. d) En milieu liquide c'est la seule espèce à prendre un aspect entièrement levuriforme.

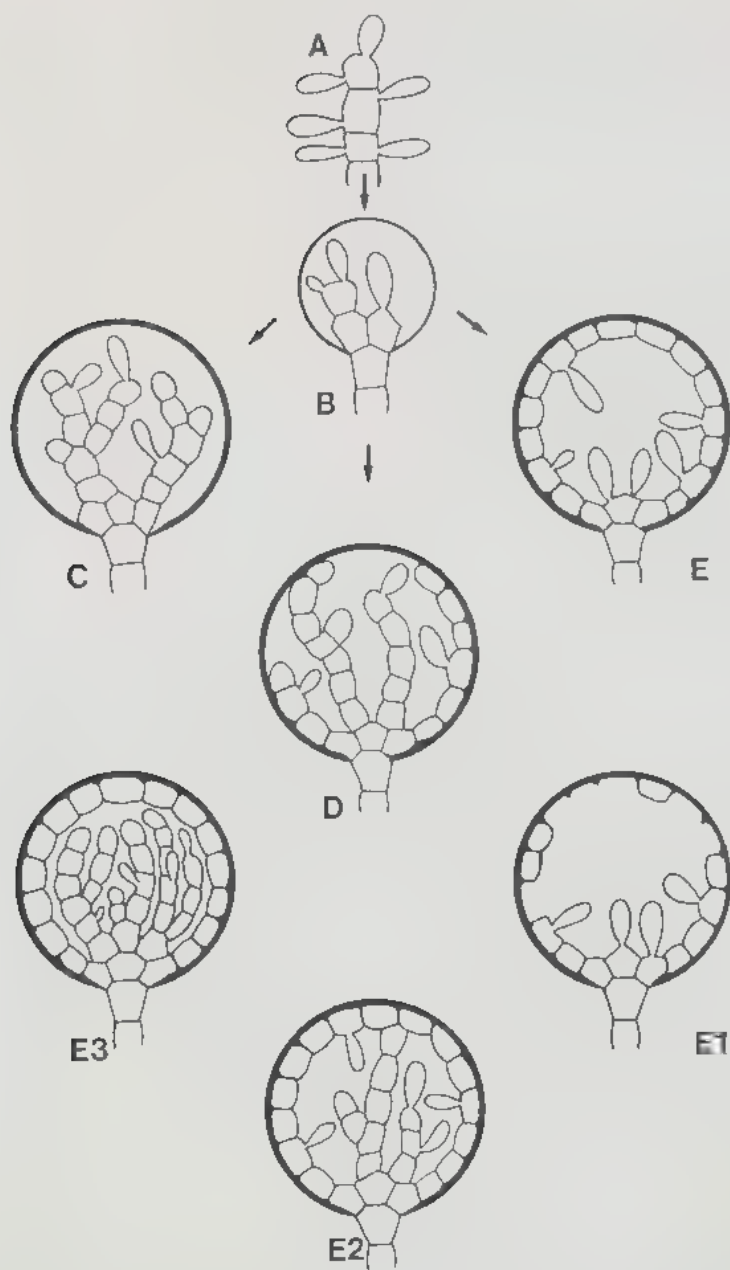


Fig. 7. — Développement et variations des pycnides de *Rhizosphaera*. Diagramme schématique (voir texte).

Comme celles de *R. oudemansi* et de *R. macrospora*, les cultures sur PDA de *R. kalkhoffii* sont du type *Hormonema*.

6. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nous avons essayé dans la figure 7 de regrouper et d'ordonner les différentes structures observées en nature et en culture par les auteurs antérieurs et nous mêmes en partant de deux hypothèses :

- les conidies sont produites par des cellules indifférenciées, sur des filaments dont la disposition peut varier,

 dans le cas de formation de pycnides, un mucilage sert d'abord de matrice pour l'organisation des filaments, puis comme revêtement externe de la paroi

A - stade hyphomycète de type *Hormonema*. *R. kalkhoffii*, *R. oudemansi* et *R. macrospora* en culture sur PDA.

B - stades primordiaux des pycnides chez *R. pini* et *R. kobayashii* en culture sur PDA. Les hyphes ne sont conidiogènes que dans certaines zones associées au mucilage.

C - identique à B mais plus évolué, tous les filaments fertiles sont enfermés dans le mucilage dont la zone externe se condense et brunit

D - un certain nombre de filaments viennent se coller contre la paroi mucilagineuse et y déterminent des plages celluleuses *R. oudemansi* et *R. macrospora* en nature, *R. pini* et *R. kobayashii* en culture.

E - tous les filaments sont intégrés à la paroi *R. pini*, *R. kobayashii* et *R. kalkhoffii* en nature (et parfois en culture pour les deux premiers).

E1 - paroi incomplète par disparition secondaire de certaines cellules dont l'empreinte est encore visible dans le revêtement mucilagineux. C'est le cas le plus fréquent pour les trois espèces étudiées dans cette note (fig. 1, 3, 5)

E2 - cas intermédiaire avec persistance de filaments internes et d'une paroi quasi complète KOBAYASHI, fig. 5, 7; MANGIN et HARIOT, fig. 5,

E3 - correspond à la figure 6a de KOBAYASHI où l'on voit une paroi complète associée à une cavité remplie de filaments. L'auteur donne cette pycnide pour immature, ce qui pourrait correspondre au stade à prosenchyme signalé par cet auteur et aussi par WATERMAN (pseudoparenchyme)

On connaît peu de choses sur le développement des pycnides SUTTON, 1973. MAIELLO et PETERSON, 1976. L'ontogénie chez *Rhizosphaera* semble être meristogène (à partir d'une seule hyphne, dans les cultures de *R. pini* et *R. kobayashii*. Pour les pycnides en nature une origine symphogène (à partir de plusieurs hyphes se réunissant) est toutefois possible. La paroi à une seule couche de cellules délimitant d'emblée une cavité apparaît propre au genre *Rhizosphaera*.

Dans notre prochaine note nous donnerons une synthèse sur le genre *Rhizosphaera* et nous examinerons la distribution géographique et botanique de ses différentes espèces, en France principalement.

Nous remercions T. KOBAYASHI pour ses échantillons et cultures, et Mmes Jacqueline HAURAT et Colette MOULIN pour leur collaboration technique

BIBLIOGRAPHIE

- GOURBIERE F. et MORELET M., 1979 — Le genre *Rhizosphaera* Mangin et Hariot. 1. *R. oudemansii* et *R. macrospora* sp. nov. *Rev. Mycol.* 43: 81-95.
- KOBAYASHI T. 1967 — Critical revision on the genera *Rhizosphaera* Mangin et Hariot and *Rhizosphaera* Petrak et Sydow a little known fungous group associated with needle disease of conifers. *Bulletin of the Government Forest Experiment Station* 204: 91-107, Tokyo, Japan.
- KUMI J. and LANG K. J., 1979 — The susceptibility of various spruce species to *Rhizosphaera kalkhoffii* and some cultural characteristics of the fungus in vitro. *For. J. Eur. Path.* 9: 35-46.
- MAIELLO J. M. and PETERSON J. L., 1976 — Pycnidium ontogeny in *Phyllosticta atramentaria*. *Mycologia* 68: 1121-1125.
- MANCIN I. et HARIOT P. 1917 — Sur la maladie du rouge du Sapin pectiné dans la forêt de la Savine (Jura). *Bull. Soc. mycol. Fr.* 23: 53-68.
- MAUBLANC M. A., 1907 — Sur la maladie des Sapins produite par le *Fusicoccum abietinum*. *Bull. Soc. mycol. Fr.* 23: 160-173.
- MUNSELL BOOK OF COLOR, 1954 — Munsell Color Co., Baltimore, Maryland, USA.
- PETRAK F. et SYDOW H. 1927 — Die Gattungen der Pyrenomyceten und Melanconium. I Teil Die pnaeosporien Sporocarpidee und die Gattung *Microphoma*. *Rept. Sp. Nov. Regni Veg. Beih.* 42, 472-474.
- SUTTON B. C. 1973 — Coelomycetes pp. 513-582. In G. C. AINSWORTH, I. K. SPARROW and A. S. SUDSMAN Eds. *The Fungus: an advanced treatise*. Vol. IV a, Academic Press, New York and London.
- VUILLEMIN M. P., 1896 — Quelques champignons arboricoles nouveaux ou peu connus. *Bull. Soc. mycol. Fr.* 12: 33-44.
- WATERMAN A. M., 1947 — *Rhizosphaera kalkhoffii* associated with a needle cast of *Picea pungens*. *Phytopathology* 37: 507-511.

ERRATUM

Rev. de Mycologie 43

p. 89. Dans la diagnose latine de *R. macrospora* une erreur a été commise quant à la localité de la récolte type Lire (Clairan, Jura) au lieu de Tarentaise (Loire).

p. 94. Modifier ainsi la légende de la planche I: F: mycélium et spores de *R. oudemansii* en culture. E: mycélium et spores de *R. oudemansii* en culture. coloration au bleu coton. - G: mycélium et spores de *R. macrospora* en culture.